

Aus der Universitäts-Frauenklinik Erlangen

Direktor: Prof. Dr. R. Dyroff.

T i e r e x p e r i m e n t e l l e U n t e r s u c h u n g e n
z u r C h e m o t h e r a p i e d e r T o x o p l a s m o s e

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

zu Erlangen

Vorgelegt von

Vinzenz Scheu

aus

Unterschleichach

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen.



Dekan: Professor Dr. Korth

Referent: Professor Dr. R. Dyroff

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Oktober 1955

Meinen lieben Eltern
gewidmet.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. Einleitung	1
II. Überblick über die wichtigsten bisherigen Therapieversuche in der Klinik und im La- boratorium zur Toxoplasmose-Infektion . .	2
a) verschiedene Protozoenmittel	3
b) Sulfonamide	4
c) Sulfone	7
d) DCEP (Daraprim)	8
e) Antibiotica	9
f) immunbiologisch-serologische Therapie	11
III. Zu den derzeitigen Therapiemöglichkeiten der klinischen Toxoplasmose	12
IV. Einführung in die Toxoplasmose-Therapie mit Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen . .	16
V. Eigene Versuchstechnik und ihre Unter- schiede gegenüber anderen Methoden . . .	21
VI. Tierexperimentelle Untersuchungen mit den Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen . .	25
VII. Erfahrungen mit Daraprim sowie vorläufige Testergebnisse mit Bemural und Bemural- derivaten bei der tierexperimentellen Toxoplasmose	43
VIII. Zusammenfassung	48

I. Einleitung.

Die Geschichte der Toxoplasmose beginnt mit dem Jahre 1908, als am Pasteur-Institut in Tunis Nicolle und Manceaux (1) den Erreger entdeckten und beschrieben. Den Namen *Toxoplasma gondii* erhielt er wegen seiner bogenförmigen Gestalt (toxobogen) und nach dem Wirtstier, bei dem man ihn zuerst entdeckt hatte, dem Gundi, einem kleinen afrikanischen Nagetier. Die nachfolgenden Untersuchungen der verschiedensten Autoren ergeben, daß ähnlich geformte Parasiten fast im gesamten Tierreich verbreitet anzutreffen sind, und auf Grund biologischer und immunbiologischer Tests konnte ihre völlige Identität oder wenigstens enge Verwandtschaft erwiesen werden (2).

Während diese Infektionskrankheit dann nahezu schon 40 Jahre in der Veterinärmedizin geläufig war, gelangte sie erst ab 1937 durch die grundlegenden Arbeiten von Wolf, Cowen und Paige (3) zur Kenntnis und Bedeutung auch in der Humanmedizin. Freilich wissen wir heute mit hoher Wahrscheinlichkeit, daß manche Krankheitsbilder des frühkindlichen und Erwachsenenalters, wie sie im älteren Schrifttum beschrieben werden, der Toxoplasmose zuzurechnen, daß sie früher nur nicht als solche erkannt worden sind.

So glaubt Mayer (4) beispielsweise, daß die von Virchow und Schminke 1920 beschriebene interstitielle Enzephalitis mit Verkalkungen identisch ist mit der toxoplasmogenen Enzephalitis, und die von Janku (5) bereits 1923 in der Retina eines hydrocephal verstorbenen Kleinstkindes gefundenen Parasiten waren ganz offenbar Toxoplasmen.

II. Überblick über die wichtigsten bisherigen Therapie- versuche in der Klinik und im Laboratorium zur Toxoplasmose-Infektion.

Überblickt man den derzeitigen Stand der Toxoplasmose-Forschung, so fällt auf, daß die eingehenden wissenschaftlichen Untersuchungen zwar zu einer zunehmenden Bereicherung unserer Kenntnisse beispielsweise über Aetiologie, Vorkommen und Epidemiologie geführt haben, daß aber andererseits diese Infektionskrankheit in Diagnose, Symptomatologie, Inkubationszeit, Infektionsmodus und vor allem in Prophylaxe und Therapie noch viele ungelöste Probleme bietet.

Wegen der wachsenden Bedeutung der Toxoplasma-gondii-Infektion, die heute bereits zum festen Krankengut des Gynäkologen, Internisten, Neurologen, Pädiaters, Röntgenologen wie Ophthalmologen gehört, und in jedem Alter unter den verschiedensten klinischen Manifestationsformen Ausfallerscheinungen macht, hat es natürlich gerade an Versuchen zur chemotherapeutischen Beeinflussung nicht gefehlt.

Das bisherige Schrifttum über Heilungsversuche der Toxoplasmose zerfällt in vielseitige tierexperimentelle Therapiestudien, sowie in klinisch-kasuistische Erfahrungsberichte der verschiedenen Disziplinen.

Bekanntlich geht man zur näheren Erforschung eines in Frage stehenden Heilmittels meist von in-vitro-Versuchen mit künstlichen Nährmedien aus und überträgt, falls eine Wirksamkeit der getesteten Verbindung vorliegt, die Prüfung sodann auf geeignete Tierkörper, um einen möglichst günstigen therapeutischen Index zu finden. Gestützt auf die hierbei gewonnenen Erfahrungen und Ergebnisse kann schließlich die klinische Testung am Patienten erfolgen.

Daß sich zwischen dem in vitro erzielbaren Wirkungsgrad und den Heilerfolgen der entsprechenden Präparate am infizierten Organismus keine völligen Parallelen finden, kann nur immer wieder betont werden und wurde auch am Beispiel der Toxoplasmose wieder einmal deutlich. Die z.T. erheblichen Differenzen

lassen sich zwar mit abweichenden Resorptionsverhältnissen und anderen Faktoren erklären, sind aber keineswegs in jeder Hinsicht schon geklärt.

Wenngleich auch wegen der nicht völlig gesicherten Entwicklungsstadien des Erregers unter den Autoren noch keine Einigung über die Klassifizierung herrscht, und die Toxoplasmose beispielsweise nach Craig und Faust (6) aus morphologischen und serologischen Gründen zu den Sarcosporidien, nach Cross (7) zu den Flagellaten und nach Westphal (8) aus mehr biologischen Überlegungen zur Gruppe der Leishmanien gerechnet wird, so lag doch der Gedanke nahe, zunächst einmal bekannte parasitostatische Chemotherapeutika auf ihren Toxoplasmose-Effekt hin zu untersuchen.

a) Verschiedene Protozoenmittel:

So untersuchten 1942 die Amerikaner Warren und Sabin (9) das Akridinderivat Atebrin als bewährtes Protozoenmittel und fanden einen bakteriostatischen Einfluß noch in einer Verdünnung von 1 : 50 000. Optochin, Rivanol, Tryparsamid, Mapharsen u.a. organische Arsenverbindungen zeigten erst nach längerer Einwirkung eine geringe und unterschiedliche Hemmwirkung. Ähnlich verhielten sich Chininum hydrochloricum, Antimonverbindungen und auch das Germanin, auf das man, wohl wegen der morphologischen Ähnlichkeit der Toxoplasmen mit den Trypanosomen der afrikanischen Schlafkrankheit, besondere Hoffnungen gesetzt hatte.

Wurden die genannten Substanzen enteral oder parenteral einem infizierten Tierkörper zugeführt, so blieb auch der geringste therapeutische Erfolg aus.

Wie wenig übereinstimmend die in der Literatur angegebenen Erfolge mit bestimmten Heilmitteln sein können, ersieht man aus einigen veröffentlichten menschlichen Toxoplasmose-Fällen, wonach sich Atebrin - im Tierversuch völlig unwirksam - kombiniert mit Plasmochin bewährt haben soll (10, 11).

Ferner ließ nach Straub (12) und Sautter (13) die intravenöse Kur mit Germanin eine aktive Augentoxoplasmosse stationär werden (Gesamtdosis 10 g, zunächst 0,5 g wöchentlich, dann 2 x wöchentlich 1 g der 10 %igen Lösung). Insgesamt will Straub in 11 Fällen von toxoplasmogen bedingten Augenerkrankungen Besserung nach Germanin-Medikation gesehen haben. Mitteilungen über negative bzw. unsichere Behandlungserfolge mit Bayer 205 (Germanin), nach Franke (14) in 3 Fällen von subchronischer Encephalomeningitis toxoplasmotica und nach Müller (15) bei Toxoplasmosse des Auges, scheinen hingegen wieder die obigen Ergebnisse von Warren und Sabin zu bestätigen.

Grundsätzlich muß bei der Bewertung von dergleichen Angaben ein strenger und vorsichtiger Maßstab angelegt werden, da es sich zunächst meist nur um Einzelfälle handelt, denen erst nach weiteren Untersuchungen allgemeine Beweiskraft zukommt.

b) Sulfonamide:

Wie die neuere medizinische Literatur beweist, gibt es kaum eine Infektionskrankheit, bei der nicht der Versuch einer Sulfonamid-Therapie unternommen wurde und sehr oft erfolgreich war. Diese bewährten Chemotherapeutika wurden darum schon sehr frühzeitig in die Untersuchungen zur Toxoplasmosse-Therapie miteinbezogen.

Ergaben die Versuche mit den obengenannten Protozoenmitteln einen positiven in-vitro- und einen negativen in-vivo-Effekt, so traten genau die umgekehrten Verhältnisse ein bei der Testung der Sulfonamide. Diese waren im Reagenzglas ohne jede anti-toxoplasmotische Wirksamkeit, konnten aber dafür im Tierexperiment, wie Warren und Sabin (16) in einer Versuchsreihe mit weißen Mäusen zeigten, eine gewisse Lebensverlängerung der therapierten gegenüber den nichttherapierten Tieren erreichen. Die besten Resultate lieferten dabei die Präparate Sulfathiazol (Cibazol) und Sulfapyridin (Eubasin). Was durch die Behandlung nicht verhindert wurde, war der Übergang der akuten Krankheitsphase in eine chronisch latente Infektion, d.h. die Tiere blieben weiterhin Parasitenträger.

Nur unter günstigen Bedingungen, niedrigen Infektionsdosen, aber hohen Sulfonamidgaben und einer protrahierten Behandlungsdauer konnten einige der Versuchstiere überleben (17).

Eine "Heilung" soll nach Warren und Sabin (16) bei solchen Mäusen eingetreten sein, die nur mit der 100fachen Infektionsdosis und weniger inokuliert worden waren und 16 Tage lang ihrem Futter 1 % Sulfathiazol bzw. 1 % Sulfapyridin beigemischt bekamen. Es wird ferner berichtet, daß selbst nach einer Infektion mit mehr als der 1000fachen tödlichen Dosis die Tiere dann weiter lebten, insofern sie in der angegebenen Weise therapiert wurden.

Da es sich bei der Toxoplasmose um obligat intrazelluläre, auf das Vorhandensein lebender Zellen angewiesene Parasiten handelt, ist ihre Züchtung außer im lebenden Organismus noch auf lebendem Gewebe möglich, Levaditi und Schoen (18) war dies, trotz anfänglicher Schwierigkeiten, bereits 1928 gelungen, indem sie befruchtete und bebrütete Hühnereier mit Toxoplasmen beimpften.

Adams und Mitarbeiter (19) nutzten dieses einfache Kulturverfahren 1949 erstmals auch dazu aus, verschiedene Substanzen auf ihren chemotherapeutischen Effekt hin zu untersuchen - und zwar durch Vergleich der Überlebenszeit der infizierten unbehandelten Kontrollembryonen zu den infizierten und behandelten. Die Ergebnisse ließen sich daningehend zusammenfassen, daß von den untersuchten Substanzen lediglich die Sulfonamide, in variablen Dosen zwischen 5 - 20 mg gegeben, die durchschnittliche Überlebenszeit der mit Toxoplasmen inokulierten Hühnerembryonen zwar verlängern, den tödlichen Ausgang der Infektion jedoch nicht verhindern konnten. Unter den von Adams geprüften Sulfonamidpräparaten erwiesen das Sulfadiazin (=Sulfapyrimidin) und Sulfathiazol den größten Hemmungseffekt und bestätigten somit grundsätzlich die Befunde von Warren, Sabin und Summers.

Die technischen Nachteile und Ungenauigkeiten, welche die perorale Applikation in Form eines prozentualen Anteils des Therapeutikums am Tierfutter immer haben muß, umgingen Weinman und Berne (20), indem sie die Sulfonamide regelmäßig parenteral verabreichten und so zu einem viel höheren Blutspiegel kamen. Die genannten Autoren berichten über gute Resultate dieser Methode bei der Bekämpfung der akuten Mäusetoxoplasmose und weisen auf die Abhängigkeit der Erfolgsquote vom zeitlichen Einsetzen der Therapie nach der Inokulation hin. Den besten toxoplasmostatischen Effekt zeigten Sulfapyridin und Sulfapyrimidin, weniger wirksam war das Sulfathiazol.

Aber ähnlich wie bei Adams, Warren und Sabin wurde auch hier nicht die Auslöschung sowohl der akuten wie chronischen Infektion erreicht, also keine echte Heilung erzielt, denn in den meisten Fällen konnten durch histologische Untersuchungen und durch das Angehen von Tierpassagen noch infektionstüchtige Toxoplasmen in den behandelten Tieren nachgewiesen werden.

In Deutschland war es als erster Wolfschlag (21), der die genannten amerikanischen Arbeiten in eigenen Versuchen nachprüfte. Aus seinen Darlegungen geht übrigens recht deutlich hervor, wie stark kleine Unterschiede in den Versuchsbedingungen und der rein technischen Durchführung die späteren Resultate zu verändern mögen, sodaß man sich nie streng genug an die leider nicht immer angegebenen Einzelheiten halten kann, will man zur Überprüfung der Ergebnisse die Experimente eines Autors unter genau den gleichen Bedingungen reproduzieren.

So kann beispielsweise, wie in einem Fall von Wolfschlag, die höhere Virulenz eines bestimmten Toxoplasmostammes die infizierten Kontrollen in genau der halben Zeit ad exitum führen wie ein anderer Stamm und damit gänzlich veränderte Voraussetzungen für das zeitliche Einsetzen der Therapie schaffen.

Was nun die von Adams bei toxoplasmainfizierten Hühnerembryonen beschriebenen Ergebnisse mit Sulfathiazol und Sulfapyrimidin betrifft, so konnte sie durch die Untersuchungen von Wolfschlag nicht bestätigt werden.

Von einer geradezu erstaunlichen chemotherapeutischen Wirksamkeit dieser beiden Substanzen berichtet der Autor hingegen in ähnlichen Tierversuchen, wie sie vor ihm schon Sabin und Warren durchgerührt hatten:

Von 20 infizierten Mäusen, die täglich je 60 mg Debenal in 1 %iger flüssiger Diät über einen Zeitraum von 50 Tagen verabreicht bekamen, überstanden 5 die Infektion, d.s. 25 %, und der analoge Versuch mit Cibazol ergab sogar eine Überlebensquote von 75 %.

So überzeugend die Ergebnisse mit den Substanzen Sulfathiazol und Sulfapyrimidin auch zu sein schienen, durfte man doch nicht annehmen, das vielgesuchte Mittel im Sinne eines "primum sanare" bereits in Händen zu haben. Biocca und Nobrega (22), Frenkel (23) und Summers (24) fanden z.B. eine bessere Erfolgsquote mit Sulfadiazin und Sulfamethazin. Ähnlich berichtet auch von Thiel (25).

Aus Experimenten von Knapp (26) geht hervor, daß Pyrimidin-Verbindungen, die nach dem Sulfaadditionsprinzip kombiniert sind, gegenüber einfachen Verbindungen eine potenzierte Wirkung erzielen konnten, so vor allem das aus der Kombination Debenal + Marbadal gewonnene Sulfonal, oder das Protocid aus Debenal M + Globucid.

c) Sulfone:

Zuvor schon war in ausländischen Arbeiten über antitoxoplasmatische Untersuchungen mit Sulfonen zu lesen (24, 27). Bekanntlich haben diese neben den Sulfonamiden eine allgemeinpraktische Bedeutung als Chemotherapeutika erlangt.

So wird das 1937 in Amerika dargestellte Promin als eines der stärksten Heilmittel gegen Lepra angesehen und ähnlich einem anderen Sulfonderivat, dem Diazon, auch gegen bestimmte Formen der Tuberkulose angewandt.

Cross (28) will mit dem Präparat Promin nicht nur die klinischen Symptome der akuten Toxoplasmose-Infektion ausgelöscht, sondern sogar das Weiterbestehen eines Trägerstatus verhindert haben. Die Überlebenszeit einiger seiner Tiere überschritt ein Jahr.

Trotzdem soll nach den Erfahrungen verschiedener Autoren und aus eigenen Versuchen nochmals gesagt werden, daß alle Feststellungen von "Heilung" stets mit einer gewissen Kritik und Vorsicht zu werten sind, da nicht selten in derartigen Fällen durch eine 2. und 3. Tierpassage es dann doch gelungen war, aus Organsuspensionen der angeblich geheilten Tiere wieder zahlreiche und infektionstüchtige Parasiten zu züchten.

d) DCEP (Daraprim):

Von den jüngsten im tierexperimentellen Toxoplasmose-Versuch diskutierten Pharmaka verdient wegen der durchaus eindrucksvollen Behandlungserfolge das DCEP (= 2,4 - Diamino, -5-(p-chlorphenyl) -6-aethylpyrimidin) Erwähnung. Daraprim, wie dieses Präparat im amerikanischen Handel heißt, ist zunächst von Falco (29) und seinen Mitarbeitern als ein wirksames Antimalariamittel befunden worden. Eyles und Coleman (30) überprüften es im Mäuseversuch sodann auch auf seinen anti-toxoplasmotischen Effekt und fanden tatsächlich bei einer mittleren Wirkungs-dosis von 9 mg/100 g Futter (ungefähr 18 mg/kg Maus entsprechend) und einer Behandlungsdauer von 14 Tagen eine deutliche Lebensverlängerung. Einige Tiere lebten noch nach einer Zeit von 42 Tagen und waren im Hirn-, Leber- und Lungenabstrich parasitenfrei.

Der therapeutische Index erwies sich leider als sehr klein, sodaß die Autoren selbst die praktische Anwendung des Mittels gegen die menschliche Toxoplasmose nicht für angebracht hielten, es sei denn, der menschliche Wirtsorganismus zeige einen günstigeren Quotienten aus der maximalen Dosis tolerata und der mittleren Wirkungs-dosis als die weiße Maus.

1950 beschrieben Greenberg und Richeson (31) eine synergistische Wirkung des Sulfadiazins und eines Pyrimidinderivats gegen das Plasmodium gallinaceum. Weil sowohl Sulfadiazin als auch Daraprim als Pyrimidinabkömmling je für sich allein einen gewissen antitoxoplasmotischen Effekt bewiesen hatten, wollten Eyles und Coleman (32) nachprüfen, ob ein ähnlicher Synergismus dieser beiden Substanzen auch gegen die Toxoplasma-Infektion in Erscheinung treten würde. Den Berichten zufolge ist dies der Fall.

Inwieweit allerdings die Ergebnisse auch auf die menschliche Toxoplasmose anwendbar sind, wird erst die klinische Prüfung entscheiden können.

e) Antibiotica:

Bei den überragenden Erfolgen, die mit den Antibiotica gegen viele der bekanntesten Infektionskrankheiten erzielt werden konnten, ist es selbstverständlich, daß sehr bald und immer wieder versucht worden ist, diese Heilmittel auch gegen die Toxoplasmose einzusetzen. Leider haben sich die großen Hoffnungen nicht erfüllt.

Augustine (33) und Mitarbeiter fanden 1944 das Penicillin unwirksam, Cross und Anigstein (34) 1948 das Streptomycin. Auch Chloromycetin, Polymycin, Bacitracin und Terramycin erwiesen weder bei der in-vitro- noch der in-vivo- Testung eine sicher verwertbare Hemmwirkung auf Toxoplasmen (35, 36, 37).

Sehr eingehend ist das Aureomycin geprüft worden, nachdem Westphal (8) bei Toxoplasmose-Kontrolluntersuchungen in einigen Fällen von negativem klinischen Befund aber positivem Sabin-Feldman-Test ganz zufällig einen Titerabfall nach Aureomycin-Behandlung beobachtete und die gleiche Erscheinung in weiteren planmäßig erforschten Fällen wiederfinden konnte. Unter der Voraussetzung, daß der genannte Sabin-Feldman-Test sich wirklich als spezifisch für die Toxoplasmose erweisen und bewähren sollte, hätte man zur Möglichkeit der frühzeitigen Erkennung der Krankheit auch gleichzeitig ein therapeutisches Mittel in der Hand gehabt.

Die Meinungen im medizinischen Schrifttum über den Wert des Aureomycins gehen nun freilich sehr auseinander:

Adams (19) und Frenkel (23) sprechen ihm jede Anwendungsmöglichkeit ab. Summers (17) hingegen will im Mäusefütterungsversuch eine Wirkung beobachtet haben, ungefähr der von Sulfathiazol entsprechend. Franke vermißt in 3 von 4 klinischen Fällen mit verschiedenen Toxoplasmoseformen jegliches Anzeichen einer Heilung, selbst bei einer starken Dosierung von Aureomycin (täglich 2 - 3 g bei einer Gesamtdosis zu 30 g). Ähnliches berichten Nelson (38) und Jakobs (39) bei der subakuten menschlichen als auch bei der tierexperimentellen Toxoplasmose.

Wurde einerseits der von Westphal und Mitarbeitern beschriebene Titerabfall im Sabin-Feldman-Test von mehreren Seiten bestätigt; so mußte andererseits der gleiche Autor mit Mohr (40) in neueren Arbeiten einen möglichen Wiederanstieg des nach mehrmonatlicher Aureomycinbehandlung gesunkenen Titers zugeben.

Im Tierexperiment waren es außer Kaess (41) und Steen (42) wieder die Amerikaner Eyles und Coleman (43), die über das Chlortetracycline (Aureomycin) eingehende Untersuchungen anstellten.

Im Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß erst ab relativ hohen Dosen eine leichte Parasitenhemmung eintrat. Demzufolge erhöhten sie die mittlere Dosis curativa noch weiter, und bei mehr als 620 mg/100 g Futter (= 1,24 g/kg Maus) wurde tatsächlich über die Hälfte der Tiere geheilt. Der Begriff der Heilung war dabei scharf definiert: die Überimpfung von Gehirn- und Lebersuspensionen der überlebenden infizierten und therapierten Mäuse auf nichtinfizierte mußte in zwei Passagen negativ verlaufen. Eine praktische Auswertung des Aureomycins gegen menschliche Toxoplasmoseformen halten Eyles und Coleman wegen der notwendigen überhohen Dosierung selbst nicht für indiziert.

f) immunbiologisch-serologische Therapie:

Schließlich wären in diesem Zusammenhang neben den rein chemotherapeutischen und antibiotischen kurz noch die immunbiologisch-serologischen Behandlungsversuche zu erwähnen.

Außer der Serumtherapie von Eichenwald (44) und Cuboni (45) ist vor allem die Frenkel'sche (23) Kombination der unspezifischen Eiweißtherapie mit Toxoplasma-Antigen bekannt geworden.

Frenkel hatte sich aus der Peritonealflüssigkeit infizierter Mäuse einen Toxoplasma-Extrakt, das Toxoplasmin, hergestellt und dieses in Analogie zur perkutanen Tuberkulin-Diagnostik im sog. Toxoplasmin-Hauttest ebenfalls zu diagnostischen Zwecken verwendet.

Gibt man nun $1/10$ - $1/100$ der Hauttestdosis 2 x wöchentlich intradermal und steigert dann graduiert je nach Toleranz, so soll es zu einer vermehrten Bildung von Antikörpern kommen, die ihrerseits die extra- und intrazellulären Antigene binden und neutralisieren.

Von verschiedenen Autoren wird dabei auf die Gefahr möglicher Herdreaktionen hingewiesen.

Die Frenkel'sche Toxoplasma-Antigen-Kombination mit unspezifischer Eiweißtherapie ist vor allem für das chronische Stadium der Erwachsenentoxoplasmose gedacht, wo die Erreger intrazellulär in Form der sog. Pseudocysten anzutreffen und erfahrungsgemäß auch durch hohe Sulfonamidgaben kaum zu beeinflussen sind.

Wegen der geringen klinischen Erfahrung läßt sich auch über diese Methode, sowie über die gleichfalls von Frenkel vorgeschlagene Übertragung von Rekonvaleszentenserum noch nichts Verbindliches sagen.

III. Zu den derzeitigen Therapiemöglichkeiten der klinischen Toxoplasmose.

Unbefriedigend wird ja überhaupt die Antwort ausfallen müssen, wenn man am Schlusse des vorangegangenen Überblicks die Frage nach den derzeitigen klinischen Therapiemöglichkeiten bei der Toxoplasmose-Infektion stellt.

Ein Mittel zur restlosen parasitologischen Ausheilung aller Stadien gibt es noch nicht. Der einzuschlagende Behandlungsweg und die therapeutischen Erfolgsaussichten sind wie bei kaum einer anderen Krankheit abhängig von der jeweils vorliegenden klinischen Manifestationsform, d.h. es wird zu berücksichtigen sein, ob es sich um eine konnatale oder postnatale Toxoplasmose in der akuten bzw. aktiven, der subakuten bis subchronischen oder der chronischen Krankheitsphase handelt.

Damit wird die Therapienotwendigkeit und- möglichkeit aber gleichzeitig mitbestimmt von der sicheren Diagnose der vorliegenden Krankheitsphase und Krankheitsaktivität.

Aus den zahlreichen bisher veröffentlichten Arbeiten zur Toxoplasmoseforschung läßt sich zu diesem Problem folgendes feststellen:

Weil die Toxoplasmose, die jedes Gewebe und sämtliche Altersklassen befallen kann, unter den vielfältigsten Manifestationsformen verläuft, ist es nur in geringen Fällen möglich, aus der klinischen Symptomatologie allein Stadium und Aktivität der Erkrankung oder diese überhaupt zu erkennen.

Die parasitologischen wie serologischen Testverfahren, die fast stets zur Sicherung der Diagnose herangezogen werden müssen, sind leider von begrenzter Anwend- und Auswertbarkeit.

So können zwar die serologischen Reaktionen zum Nachweis von Antikörpern, wie sie dem Sabin-Feldman-Test, der Komplement-

Bindungsreaktion nach Westphal oder dem Frenkel'schen Toxoplasmin-Hauttest zugrunde liegen, sehr leicht durchgeführt werden, der positive oder negative Ausfall besitzt jedoch nur indirekte Beweiskraft. Ein positives Testergebnis braucht allein noch keine Therapie zu indizieren, da es wie in vielen Fällen z.B. nur der serologische Ausdruck einer ruhenden Infektion oder stillen Fehlung sein kann.

Der direkte mikroskopische Parasiten-Nachweis ist zwar immer erstrebenswert, jedoch schwierig, und dürfte in chronischen Fällen oft unmöglich werden.

Aussichtsreicher ist das Tierexperiment mit intraperitonealer Überimpfung des in physiologischer Kochsalzlösung emulgierten Untersuchungsmaterials. Gegenüber den serologischen Methoden besitzt der tierexperimentelle Erregernachweis den großen Nachteil der langen Untersuchungsdauer - es können bis zu drei Tierpassagen notwendig werden - und der weit höheren Gestehungskosten.

Wenn auch wegen dieser angedeuteten Schwierigkeiten einer exakten und rechtzeitigen Aktivitäts- bzw. Stadien-Diagnose und des immer noch bestehenden Mangels eines spezifischen Heilmittels die Toxoplasmose-Therapie für den behandelnden Arzt weiterhin ein ernstes Problem darstellen wird, so haben sich aus den bisher gewonnenen Erfahrungen in Klinik und Labor doch schon einige Behandlungsgrundsätze abgezeichnet.

Liegt eine aktive behandlungsbedürftige Toxoplasmose vor, diagnostiziert durch direkten Erregernachweis, im Tierversuch, aus serologischen Reaktionen mit oder ohne klinische Kardinal-Symptome, so wird am besten eine massive intravenöse oder perorale Sulfonamid-Therapie eingeleitet.

Am bekanntesten ist das nach dem Sulfaadditionsprinzip kombinierte Sulfonal. Als wirksamer Faktor wird, ähnlich wie beim Protocid, die Methylsulfapyrimidinkomponente angesehen.

In Form des Solu-Supronal besitzt es den Vorteil der intravenösen Applikation und erreicht so leichter den gewünschten hohen Blutspiegel. Dementsprechend hoch sind auch die verabreichten Dosen.

Nach Feststellung der individuellen Verträglichkeit mit Hilfe einer 10fach verdünnten Solu-Supronal-Lösung gibt Franke und Horst (46) täglich 2 x 4 g i.v. bis zu einer Gesamtdosis von 80 g, was einer Behandlungsdauer von 10 Tagen entspräche.

In manchen Fällen kann es für einen wirklichen Stillstand der Progredienz und zur Vermeidung von Recidiven notwendig werden, diese Kur zeitlich noch länger auszudehnen oder unter Umständen zu wiederholen, sofern nicht toxische Nebenerscheinungen ein Absetzen der Sulfonamid-Behandlung erforderlich machen.

Vor und während der Therapie sind wiederholte Kontrollen der Leber- und Nierenfunktionen durchzuführen.

Nach Erfahrungsberichten von Bohn und Koch (47) sowie Horst und Franke sind die Erfolge umso besser, je früher mit der Therapie begonnen wurde.

Den Wirkungsmechanismus der Sulfonamide bei der akuten Toxoplasmose erklären Forscher wie Frenkel (48), Warren (49) u.a. dahingehend, daß in akuten Stadien die Parasiten ihre Wirtszelle verlassen, hämatogen streuen und nun als freie, extrazelluläre Formen von den Sulfonamiden in ihren wichtigsten Lebensfunktionen gehemmt werden können - im Gegensatz zum chronischen Stadium, wo die Erreger intrazellulär in den Pseudocysten gelegen sind und selbst auf höchste Dosen nicht ansprechen.

Diese Darstellung des Wirkungsmechanismus erklärt auch die schlechteren Ergebnisse der Sulfonamide bei den subakuten bis subchronischen Formen, wo die bereits gesetzten Schädigungen offenbar irreparabel sind.

Trotzdem empfiehlt sich auch hier noch eine adäquate Anwendung von Sulfonamiden. Desgleichen erscheinen Germaningaben trotz uneinheitlicher Ergebnisse (siehe Seite 4) nicht völlig aussichtslos.

Nach den Erfahrungen von Mohr und Westphal (50) wäre über einen Zeitraum von etwa 2 Wochen täglich 2 bis 3 g Aureomycin zu geben, wegen des meist fieberfreien Verlaufs vielleicht noch kombiniert mit Pyrifur.

Die Behandlung der chronischen Erwachsenenentoxoplasmose ist auch heute noch so gut wie ohne jeden Erfolg. Die in den Terminalkolonien befallener Organe sitzenden Erreger sind praktisch für alle Chemotherapeutika unzugänglich.

Dies gilt vor allem für die ruhenden chronischen Fälle, wo jegliche Ruptur von Pseudocysten und damit das Freiwerden von Parasiten fehlt. Für dieses Stadium steht, wie bereits erwähnt, außer der Serumtherapie von Eichenwald und Cuboni, augenblicklich nur die Frenkel'sche Kombination von Toxoplasmaantigen mit unspezifischer Eiweißtherapie zur Auswahl.

VI. Einführung in die Toxoplasmose-Therapie

mit Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen.

Die Tatsache, daß die geringen Fortschritte in der chemotherapeutischen Beeinflussung der Toxoplasmose in keinem Verhältnis stehen zu der wachsenden klinischen Bedeutung dieser Infektionskrankheit, hat uns Veranlassung gegeben, auch an der hiesigen Universitäts-Frauenklinik in einer Reihe von Tierexperimenten eingehende Untersuchungen über den toxoplasmostatischen Effekt verschiedener Substanzen durchzuführen.

Der Gedanke, den hemmenden Einfluss der Sulfonamide auf das Toxoplasma gondii durch geeignete Kombination mit aromatischen Arsenverbindungen im Sinne eines chemotherapeutischen Synergismus zu steigern, hatte zur Erprobung von Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen geführt (51).

Diese Substanzen wurden erstmals von Pfleger (52) dargestellt und sind dadurch gekennzeichnet, daß die Azogruppe als Brückenglied den Sulfonamidanteil mit der aromatischen Arsenkomponente verbindet.

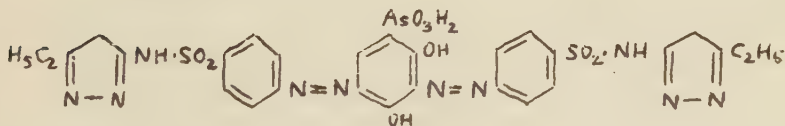
Arsenikalien für sich allein sind von verschiedener Seite (wie im Abschnitt II/a bereits dargelegt) auf ihren anti-toxoplasmotischen Effekt untersucht und als zu wenig und zu unterschiedlich wirksam befunden worden. Kombinationsverbindungen von substituierten aromatischen Arsinsäuren mit Sulfonamiden hingegen zeigten einen ausgesprochen hemmenden Einfluß bei der Laborinfektion bei der weißen Maus.

Die chemische Darstellung gelang Pfleger durch Kupplung von N^4 diazotierten Sulfonamiden, beispielsweise Globucid, Citazol, Albucid, Pyrimal, mit Resorcinarsinsäuren, 5- Nitroresorcinarsinsäure, 2- Methyl-4-Oxyphenylarsinsäure u.a. im alkalischen Milieu.

Die Arsinsäuren werden in 2n-NaOH gelöst und bei 0°Celsius mit der Diazoniumsalzlösung oder -suspension langsam versetzt. Aus den intensiv gefärbten Lösungen lassen sich die Kupplungsprodukte mittels Säuren ausfällen und durch Zentrifugieren isolieren. Es handelt sich um amorphe, meistens braune Farbstoffe, die in organischen Solventien nur schwer löslich sind. Sie werden in Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet, da sie sich im feuchten Zustand schon bei 50-60° zu zersetzen beginnen. Im trockenen Zustand ist ihre Temperaturbeständigkeit größer.

Die Reinigung dieser Farbstoffe gelingt durch wiederholte Umfällung über die entsprechenden Natriumsalze und nachfolgende Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel, meistens Isopropanol. Zur Reinigung für die Analyse ist eine nochmalige Umfällung, Auswaschen mit dest. Wasser bis zur vollständigen Kochsalzfreiheit und erneute Extraktion notwendig.

Als Beispiel sei die Reaktion von diazotiertem Globucid mit der 2,4-Dioxyphenylarsinsäure wiedergegeben:



Die tierexperimentelle Prüfung der Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen bei der Toxoplasma-gondii-Infektion erfolgte in Zusammenarbeit mit der hiesigen Universitäts-Frauenklinik. Dabei ist folgendermaßen verfahren worden:

Vorversuche sollten zunächst über die Toxizität der zu testenden Verbindungen aufklären. Diese drückt man gewöhnlich durch die sog. LD 50 aus, d.h. es wird die für 50 % der Tiere Letale Dosis festgestellt. Dubois wandte dabei das Verfahren von Behrens (53) an.

Nach der tierexperimentellen Ermittlung der LD für ein Kupplungsprodukt wurde für weitere Kupplungsprodukte mit dem gleichen Arsengrundkörper die LD bzw. die Dosis tolerata rein rechnerisch ermittelt nach der Beziehung:

$$\frac{\text{Dosis tol. von Subst.}_1}{\text{Dosis tol. von Subst.}_2} = \frac{\text{Arsen-Gehalt in \% von Subst.}_1}{\text{Arsen-Gehalt in \% von Subst.}_2}$$

Es wurde dabei angenommen, daß die verschiedenen Substituenten am N¹ der Sulfonamidgruppe keinen wesentlichen Einfluß auf die Toxizität der Verbindung besitzen.

Durch Versuch bestimmt:

Resorcinarsinsäure-Cibazol LD 50 = 3,6 mg/g Maus

Dosis tol. = 2,5 mg/g Maus

Daraus berechnet z.B.:

Resorcinarsinsäure-Globucid LD 50 = 3,85 mg/g Maus

Dosis tol. = 2,68 mg/g Maus

Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß die so erhaltenen Werte nur in erster Näherung gültig sein können, da verschiedene Faktoren, wie z.B. Unterschiede in den Resorptions- und Ausscheidungsverhältnissen oder in der Verträglichkeit sich rechnerisch nie erfassen lassen.

Die Toxizitäten der Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen, ausgedrückt durch die Dosis letalis, liegen zwischen 1,7 und 3,7 g/kg Maus, die Dosis tolerata zwischen 1,3 und 2,0. Am günstigsten verhielten sich die Kupplungsprodukte der 2,4-Dioxyphenylarsinsäure.

Unter Zugrundelegen der Dosis tolerata erfolgten sodann orientierende Versuche bei der experimentellen Mäusetoxoplasmose, um einen Überblick über den therapeutischen Wert der Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen zu bekommen.

Jeweils 1500 Toxoplasmen gelangten zur subkutanen Inokulation eines Tieres. Bei dieser Dosierung betrug die durchschnittliche Überlebenszeit rund 9 Tage. Nach einer Latenzzeit von 2 Tagen erfolgte die Therapie mit einer Suspension der Substanzen in 1 %iger Adulsionslösung bei peroraler Applikation mit einer Magensonde. Die besten Ergebnisse, gemessen an der Lebensverlängerung bzw. am Überleben der behandelten Tiere gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren, wiesen dabei jene Sulfonamidkörper auf, die mit der 2,4-Dioxyphenylarsinsäure gekoppelt waren, und unter den Sulfonamidkomponenten selbst waren vor allem Globucid, Cibazol, aber auch Albucid am wirksamsten.

Globucid und Cibazol, gekuppelt mit Resorcinarsinsäure, wurden bei gleicher Infektion und Therapietechnik weiter untersucht. Die Ergebnisse von Dubois lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) Bei einmaliger Gabe von 80 % Dos.tol. der Kombinationsverbindung Resorcinarsinsäure-Globucid waren von 35 Mäusen nach einer Beobachtungszeit von 3 Monaten 31 am Leben, d.s. 88 %. Bei dem Kupplungsprodukt Resorcinarsinsäure-Cibazol betrug die Überlebensquote in einem analogen Versuch 25 Tiere, d.s. 71 %. Die Kontrolltiere erreichten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 7,9 Tagen.
- 2) Von 20 Mäusen, am 2. und 5. Tag nach Infektion mit je 40 % Dos.tol. behandelt, überlebten bei Resorcinarsinsäure-Globucid nach 2 Monaten noch 15 Tiere, d.s. 75 %, bei Resorcinarsinsäure-Cibazol 8 Tiere, d.s. 40 %.

- 3) Das Kupplungsprodukt Resorcinarsinsäure-Globucid wurde in einem weiteren Versuch getestet, bei dem die Therapie am 2., 5. und 7. Tag nach der Infektion mit je 25 % der Dos. tol. erfolgte. Von 20 infizierten Tieren lebten nach 2-monatiger Beobachtungszeit noch 13, d.s. 65 %.

Diese Untersuchungen zeigen einen eindeutigen antitoxoplasmotischen Effekt der genannten Verbindungen, wobei die beste chemotherapeutische Wirkung bei Verabreichung einer einmaligen hohen Dosis erzielt werden konnte. Kleinere und auf mehrere Tage verteilte Dosen haben offenbar eine Verminderung der Wirksamkeit zur Folge.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst untersucht werden, inwieweit diese Ergebnisse, die nur auf eine einzige Versuchsreihe gestützt sind und somit vielleicht als Zufallsbefund gedeutet werden könnten, sich unter gleichen oder modifizierten Versuchsbedingungen bestätigen lassen.

V. Eigene Versuchstechnik
und ihre Unterschiede zu anderen Methoden.

Alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden an weißen Mäusen durchgeführt. Diese gelten allgemein neben Goldhamstern, Kaninchen und Meerschweinchen als besonders für den Tierversuch geeignet, nicht weil bei ihnen eine ausgesprochene Artspezifität für die Toxoplasmose-Infektion gegeben wäre - eine solche läßt sich im Gegenteil im gesamten Tierreich nicht nachweisen, und de facto können alle Tierarten von dem Erreger befallen werden -, sondern weil erfahrungsgemäß latente Spontaninfektionen bei weißen Mäusen sehr selten sind.

Von Vorteil ist ferner, daß bei diesen Versuchstieren ein positiver Infekt durch augenfällige äußere Symptom wie Freßunlust, struppiges Fell, körperliche Erschöpfung gekennzeichnet ist und spätestens 14 Tage post infectionem durch generalisierte Toxoplasmose ad exitum führt. In der Überlebensquote bzw. der Lebensverlängerung der behandelten Tiere hat man somit einen guten Indikator für den therapeutischen Wert eines Mittels.

Für alle Versuche wurden nur gleichgeschlechtliche, kräftige, nicht unter 20 g schwere Tiere verwendet und diese zu je 5 in Gläsern untergebracht.

Die Inokulation mit *Toxoplasma gondii* handhabten wir ähnlich wie Dubois in der Weise, daß wir eine infizierte Maus *) kurz nach Auftreten der ersten äußeren Krankheitssymptome mit Chloroform oder Aether abtöteten und durch Einspritzen von 1 cm³ steriler physiologischer Kochsalzlösung in die freie Bauchhöhle eine Suspension von toxoplasmahaltigem Aszites herstellten.

*) Herrn Dr. Otten, Hamburg, Parasitologisches Laboratorium, gebührt an dieser Stelle besonderer Dank für die freundliche Zusendung der mit *Toxoplasma gondii* infizierten Mäuse.

Nach vorsichtigem Massieren und Eröffnen des Bauchraumes wurde die leicht visköse Flüssigkeit mittels Spritze abgesaugt.

Wie aus dem einschlägigen Schrifttum zu ersehen ist, erfolgt die Festsetzung der Infektionsdosis pro Maus in den Versuchstechniken der einzelnen Autoren nicht einheitlich.

Wolfschlag, Knapp u.a. inokulierten bei ihren Untersuchungen die Tiere mit bestimmten Volumeinheiten des verdünnten toxoplasmahaltigen Peritonealexsudats, nachdem zuvor tierexperimentell die mittlere Dosis letalis dieses Aszites bestimmt worden war. Maßstab für die Infektionsstärke ist hier ein Vielfaches der MDL.

Bei zeitlich auseinanderliegenden Versuchsreihen kann man leider nicht die gleiche Maus bzw. deren Peritonealexsudat als Infektionsquelle benützen, da die Toxoplasmen in der Aszitesflüssigkeit höchstens 18 - 50 Stunden lebensfähig bleiben.

Es zeigt sich nun aber, daß die Anzahl Erreger und damit die Infektionskraft pro Volumeinheit Aszites bei den einzelnen Tieren entsprechend dem Stadium und der Intensität der Erkrankung sehr großen Schwankungen unterworfen ist. Eine einmalig bestimmte MDL kann somit nicht ohne weiteres auf jede Aszitessuspension übertragen werden.

Um für eine inhaltlich zusammenhängende Versuchsreihe trotzdem eine genaue Vergleichsmöglichkeit der jeweils zugrundeliegenden Infektionshöhe zu erzielen, müßte darum die MDL des Infektionsmaterials von Fall zu Fall neu ermittelt werden, was umständlich und zeitraubend ist.

Wir umgingen diese Schwierigkeit, indem wir ähnlich wie Eyles und Coleman die Infektionsdosis stets nach Erregerzahl festlegten.

Die Toxoplasmen wurden in der Thoma-Zeiss-Zählkammer wie Blutelemente ausgezählt, auf 1 cm^3 Aszites berechnet, und diese Menge mit steriler physiologischer Kochsalzlösung so verdünnt, daß die gewünschte Anzahl Parasiten in $0,1 \text{ cm}^3$ der Flüssigkeit enthalten war. Damit erfolgte die subkutane Beimpfung.

Die exakte Dosierung von jeweils $0,1 \text{ cm}^3$ gelang mit Hilfe einer Tuberkulinspritze, die eine Genauigkeit der Abmessung von $1/100 \text{ cm}^3$ gestattet.

Die Möglichkeit einer unterschiedlichen Virulenz der Parasiten bei gleicher Anzahl bleibt freilich bestehen. Sie dürfte jedoch bei Verwendung eines stets gleichen Erregerstammes nicht allzu groß sein und müßte sich in der veränderten durchschnittlichen Lebenszeit der Kontrolltiere äußern. Diese ist somit der sicherste Maßstab für die Stärke der Infektion.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden peroral gegeben. Ausschlaggebend für die Wahl dieser Applikationsform waren physikalisch-pharmakologische Gegebenheiten der Stoffe, wie Löslichkeit, Toxizität, Wirksamkeit, Verträglichkeit usw. Nachgewiesenermaßen sind Arsenikalien mit 5-wertigem Arsen, wie es bei den Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen der Fall ist, enteral wirksamer als parenteral. Sie stehen damit im Gegensatz zu den meisten Chemotherapeutika.

Das Problem der peroralen Applikation ließe sich im Tierversuch technisch am einfachsten dadurch lösen, daß man die zu untersuchende Substanz prozentual dem Tierfutter zusetzt. Diese Methode einer festen oder flüssigen Diät wird von vielen Autoren angegeben (16, 21, 24).

Wir selbst halten sie für ungenau, da sich nicht sicher ermitteln läßt, wieviel das einzelne der in gemeinsamem Stall untergebrachten Tiere von der gemeinsamen Nahrung zu sich genommen hat und welcher Prozentsatz bei der Futteraufnahme verlustig gegangen ist.

Es wurde darum die Applikation nach Angaben von Behrens (53) mit einer Schlundsonde durchgeführt und dadurch die Dosierung genau geregelt.

Die Handhabung einer solchen Sonde erfordert eine gewisse Übung, bis man sie ohne Läsion der Schleimhaut durch den mehrfach geknickten Oesophagus der Maus einführen kann. Ferner ist die Gefahr einer Magenperforation nicht unerheblich.

In unseren Versuchen kam eine Schlundsonde mit den von Dubois angegebenen Maßen zur Anwendung: Länge 6 cm, Außendurchmesser 1,35 mm, Außendurchmesser des verdickten und abgerundeten Kopfes 1,75 mm. Das Ende kann auf eine gewöhnliche Rekordspritze aufgesteckt werden. Vor dem Einführen taucht man die Sonde kurz in Olivenöl, um sie gleitfähiger zu machen.

Weil es sich bei den Arsen-Sulfonamid-Azofarbstoffen um in Wasser und Alkohol faktisch unlösliche Verbindungen handelt, müssen ihre amorphen Pulver in pharmakologisch indifferenten Flüssigkeiten suspendiert werden. Als am besten geeignet hat sich eine Auflösung von Adulsion (Grundstoff für Mucilago Tylose) in Wasser erwiesen, und zwar in 1 %iger Konzentration.

Man füllt eine 2 cm³- Spritze von großem inneren Durchmesser mit 1/2 cm³ der Adulsionslösung, suspendiert mit einem Glasstab die hinzugeschüttete Substanz und gibt nochmals die gleiche Menge Adulsionslösung nach.

VI. Tierexperimentelle Untersuchungen mit den

Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen.

In dem durch Abb. 1 dargestellten Versuch sollte die von Dubois beschriebene Testung des Kupplungsproduktes Resorcinarsinsäure-Globucid (=S 20), des bisher wirksamsten Präparats der Arsen-Sulfonamid-Azofarbstoffe, reproduziert und daneben vergleichsweise statt der Arsen-Azoverbindung des Cibazols die des Albucids überprüft werden.

Wir setzten die Versuche so an, daß in drei Untersuchungsreihen die unbehandelten Kontrolltiere sowie die mit "S 20" bzw. "S 18" therapierten Tiere gleichzeitig beobachtet wurden.

Abb.1: Darstellung der Lebensverlängerung und Überlebensquoten von toxoplasmoseinfizierten Mäusen bei Behandlung mit:

- a) Kuppl.-Produkt Resorzinarsinsäure-Globucid (= S 20)
- b) Kuppl.-Produkt Resorzinarsinsäure-Albucid (= S 18)

Anzahl der Versuchstiere: je 10 Mäuse

Infektionsdosis/Maus: 11 000 Toxoplasmen

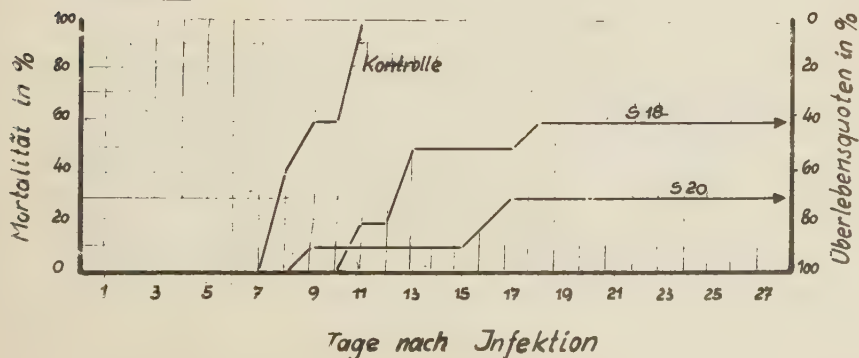
Therapie: 1 x 80 % Dos.tol. "S 20" = 2,14 mg/g Maus

bzw. 1 x 80 % Dos.tol. "S 18" = 1,68 mg/g Maus

Applikation: peroral in 1 %iger Adulsionlösung

Therapiebeginn: 2 Tage nach Infektion

Abb. 1



Dubois hatte bei einer Infektionsdosis von 1500 Toxoplasmen pro Maus und einer durchschnittlichen Lebenszeit der Kontrolle von 7,9 Tagen nach Infektion durch die einmalige Gabe von 80 % Dos. tol. "S 20" eine Überlebensquote von 88 % erzielt (s.S. 19). Wie das Ergebnis von Abb. 1 zeigt, konnte die gleiche Substanz unter unseren Versuchsbedingungen dieser hohen Prozentsatz nicht ganz erreichen.

Es überlebten von 10 Tieren nach einer Beobachtungszeit von 2 Monaten 70 %

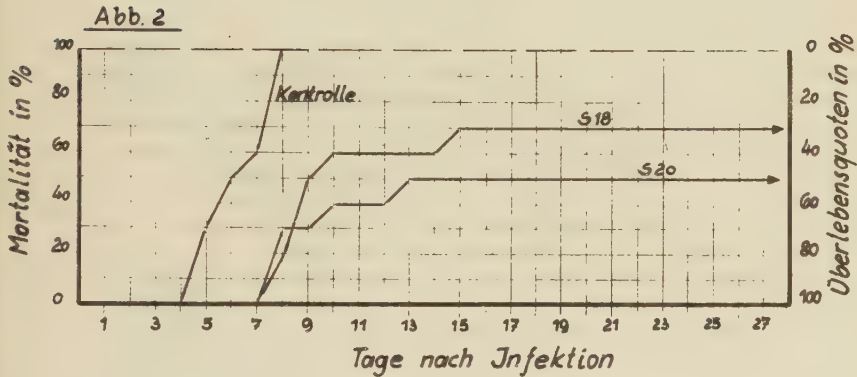
Es wäre naheliegend, diesen wenn auch geringen Wirkungsabfall durch die höhere Infektionsdosis (1500 : 11 000 Toxoplasmen pro Maus) bedingt zu sehen. Dagegen spricht jedoch die Lebenszeit unserer nichtbehandelten infizierten Kontrolle mit einem Durchschnitt von 8,2 Tagen nach Inokulation, die somit sogar noch etwas höher liegt als bei Dubois.

Die Erklärung für diese Erscheinung könnte noch in einer unterschiedlichen Virulenz der jeweils zur Infektion verwendeten Erreger oder in der Konstitution der Mäuse gesucht werden. Überhaupt ist ja zu berücksichtigen, daß es sich hier um Tierexperimente, also um lebendes Versuchsmaterial handelt, wo naturgemäß die biologische Schwankungsbreite der Ergebnisse oft recht beträchtlich und schwer zu beeinflussen ist.

Die mitgetestete Verbindung "S 18" fällt in ihrer Wirkung auf das Toxoplasma gondii gegenüber "S 20" ab. Die Lebenszeit der bis zum 18. Tag nach Infektion gestorbenen Tiere betrug 12,2 Tage, die endgültige Überlebensquote 40 %.

In einer weiteren Versuchsreihe modifizierten wir die Bedingungen dahingehend, daß wir die Infektionsdosis pro Maus mehr als verdoppelten und erst am 3. Tage nach Inokulation mit der Therapie begannen. Das Ergebnis ist in Abb. 2 dargestellt.

Abb. 2: Darstellung der Versuchsergebnisse bei Erhöhung der Infektionsdosis von 11 000 auf 25 000 Toxoplasmen/Maus und Therapiebeginn 3 Tage nach Inokulation.



Die durchschnittliche Lebenszeit der Kontrolle beträgt zufolge obiger Darstellung 5,6 Tage, ein klarer Ausdruck für den rapiden, hochakuten Krankheitsverlauf. Obwohl die Therapie erst einen Tag vor Exitus der ersten Kontrolltiere, also offensichtlich erst im Stadium einer schon fortgeschrittenen Generalisierung der Infektion einsetzte, blieben von den mit "S 20" behandelten Tieren noch 50 %, von den mit "S 18" behandelten noch 30 % am Leben.

Es bestätigte sich also auch in unsern Versuchen die von anderer Seite gemachte Erfahrung, daß einmal die Intensität einer Toxoplasmose-Erkrankung direkt proportional ist der Zahl und Virulenz der Erreger, somit ein ähnliches Verhalten vorliegt wie bei allen anderen Infektionskrankheiten, und daß andererseits die mit den bisher angewandten Chemotherapeutika im Tierversuch erzielten Heilungs- und Überlebensquoten in umgekehrtem Verhältnis stehen zur jeweiligen Stärke der Infektion

Es interessierte in diesem Zusammenhang genauer, welchen Einfluß zeitliche Veränderungen zwischen Infektion und Therapiebeginn auf das Ergebnis haben. (Der durch Abb. 2 dargestellte Versuch erlaubt diesbezüglich noch keine sicheren Aussagen, da außer dem Zeitpunkt der Therapie gleichzeitig noch die Infektionsdosis pro Maus verändert wurde, somit zwei variable Größen gegeben waren.)

Es mußte u. E. das Bestreben der Therapie sein, zur Zeit der Hauptgefährdung eine genügend hohe und lang anhaltende Blutkonzentration des Heilmittels zu erzielen. Sowohl bei zu früher Medikation wegen der inzwischen schon fortgeschrittenen Elimination als auch bei der zu späten Therapierung mußte ein Wirkungsabfall eintreten.

Dieses Problem interessierte auch deswegen, weil in den vorangegangenen Versuchen 2 - 3 Tage lang nach Applikation bei sämtlichen Versuchstieren mäßige bis starke Durchfallserscheinungen aufgetreten waren. Es konnte dies als mögliche Folge einer intestinalen Unverträglichkeit der Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen im allgemeinen oder einer zu hohen, toxischen Dosierung erklärt werden.

Bei der peroralen Anwendung eines Therapeutikums wird neben der Allgemeinwirkung stets mit einer gewissen örtlichen Wirkung auf Magen- und Darmschleimhaut zu rechnen sein, insbesondere wenn es sich, wie hier, um schwerlösliche oder gar unlösliche Stoffe handelt.

Jedenfalls lag der Schluß nahe, daß abführende Wirkung und physiologische Elimination des Heilmittels sehr wohl einen nur begrenzten zeitlichen Spielraum für eine erfolgreiche Therapie zulassen.

Abb. 3: Beziehung zwischen zeitlichem Einsetzen der Therapie und toxoplasmostatischer Wirkung, dargestellt an toxoplasmoseinfizierten Mäusen und einer Medikation mit Resorcinarsinsäure-Cibazol (= S 23)

Anzahl der Tiere: je 10 Mäuse

Infektionsdosis/Maus: 24 000 Toxoplasmen

Therapie: 1 x 60 % Dos.tol. "S 23" = 1,49 mg/g Maus

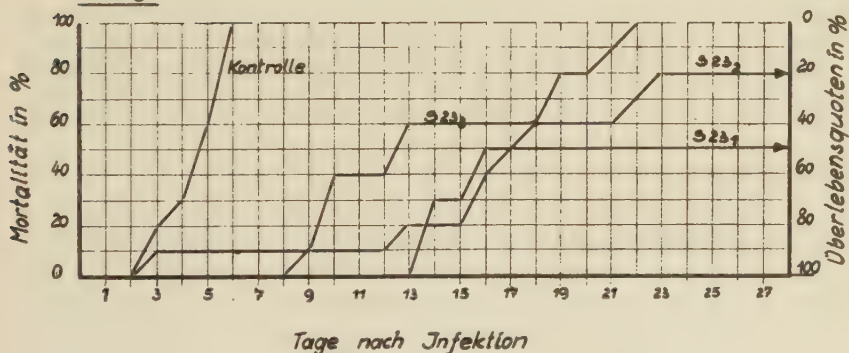
Applikation: peroral in 1 %iger Adulsionslösung

Therapiebeginn: S 23₁ - am Infektionstag

S 23₂ - 2 Tage nach Infektion

S 23₃ - 3 Tage nach Infektion

Abb. 3



Wie aus Abb. 3 zu ersehen ist, erstreckt sich das Absterben der Kontrolle über 4 Tage, ist also leicht protrahiert. Die durchschnittliche Überlebenszeit nach der Infektion berechnet sich auf 3,9 Tage. Wertet man die über einen Zeitraum von 6 Wochen gehenden Mortalitätskurven der drei Parallelversuche aus, so erkennt man:

- a) Bei einmaliger Gabe der auf 60 % Dos.tol. reduzierten Menge an Resorcinarsinsäure-Cibazol am Tage der Inokulation bleiben von den Mäusen 50 % am Leben.

- b) Bei Medikation am 2. Tag nach Infektion, zu einer Zeit also, wo die ersten Kontrolltiere schon eingehen, fällt die chemotherapeutische Wirkung, gemessen wieder am Prozentsatz der überlebenden Tiere, um 30 %. (Der vom 2. auf 3. Tag erfolgte Exitus der einen Maus von S 20₂ dürfte auf mechanische Läsion bei der Applikation zurückzuführen sein, obgleich die Autopsie keine Magenperforation ergab.)
- c) Bei Therapie am 3. Tag nach Beimpfung kann das Kupplungsprodukt zwar noch eine eindeutige Lebensverlängerung gegenüber der Kontrolle erzielen, jedoch nicht verhindern, daß spätestens innerhalb von 3 Wochen sämtliche Tiere sterben.

Für die Behandlung der akuten Toxoplasmose mit den Arsen-Sulfonamid-Azofarbstoffen, zunächst nur auf die experimentell gesetzte Infektion der weißen Maus bezogen, wäre aus diesen Beobachtungen die Folgerung zu ziehen, mit den therapeutischen Maßnahmen in einem möglichst frühen Stadium einzusetzen. Einer der Gründe könnte sein, daß Arsinsäuren durch fermentative Einflüsse erst zu aktiven Wirkformen umgebaut werden müssen.

Nach Voegtlin (54) stellen nämlich im tierischen Organismus die durch Reduktion der Arsinsäuren bzw. Oxydation der Arsenobenzole entstehenden Arsinoxide die eigentliche therapeutisch aktive Form der aromatischen Arsenikalien dar; u.a. wird als Beweis für diese Hypothese eben angeführt, daß die Arsinsäuren und Arsenoverbindungen zur Entfaltung ihrer vollen Wirksamkeit einer bestimmten Latenzzeit bedürfen, nicht dagegen die Arsinoxide.

Die Erprobung der Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen in der tierexperimentellen Toxoplasmose ist, wie eingangs erwähnt, von dem Gedanken ausgegangen, bei dieser Stoffklasse möglicherweise einen synergistischen Effekt zwischen Sulfonamiden und aromatischen Arsenverbindungen auszunützen. Die erzielten Erfolge sprechen durchaus für die Richtigkeit der Annahme.

Es stellte sich die Frage, um welche Art von Wirkungssteigerung es sich hierbei handle. Die Wahrscheinlichkeit einer rein additiven Kumulierung, einer einfachen Summierung der Einzelwirkungen schied praktisch aus, nachdem sich zwar die Sulfonamide, nicht aber die aromatischen Arsenverbindungen für sich allein als Toxoplasmostatika erwiesen haben. Es schien vielmehr ein ähnliches Verhalten vorzuliegen die in einer Untersuchungsreihe von Eyles und Coleman (32), wo Paludrin, obgleich für sich allein inaktiv bei der Toxoplasmose, die Wirkung von Sulfadiazin potenzierte. Der wesentliche Unterschied dieser beiden Stoffe zu den Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen besteht aber darin, daß es sich bei ihnen um ein physikalisches Gemenge handelt, während in den Kupplungsprodukten die einzelnen Komponenten chemisch miteinander verbunden sind.

Der folgende Versuch sollte zeigen, inwieweit mit der Resorcinarsinsäure und den Sulfonamiden ein ähnlich guter antitoxoplasmotischer Effekt zu erzielen war, wenn sie nicht als Kupplungsprodukte, sondern im gleichen quantitativen Verhältnis als physikalisches Gemenge gegeben wurden.

Um vergleichsweise ein Wirkungsbild der Einzelkomponenten zu erhalten, wurde in einem Vorversuch Resorcinarsinsäure sowie Globucid bzw. Cibazol zunächst für sich allein getestet.

Die Bestimmung der Dosis tolerata von Resorcinarsinsäure erfolgte dabei rechnerisch unter Zugrundelegung der von Dubois experimentell ermittelten Dos. tol des Kuppl.-Produktes von Resorcinarsinsäure-Cibazol (= S 23).

Dos. tol S 23 = 2,49 mg/g Maus

berechneter Arsengehalt S 23 = 7,98 %

berechneter Arsengehalt von Resorcinarsinsäure = 32,05 %

Nach der auf Seite 18 wiedergegebenen Beziehung ergibt sich als Dos. tol. Resorcinarsinsäure 0,75 mg/g Maus.

Die Medikation erfolgte bei der Resorcinarsinsäure mit 50 % Dos. tol. in 2 %iger Lösung, bei den Sulfonamiden Globucid und Cibazol jeweils mit 2 mg/g Maus. Therapiert wurde einmalig, peroral, am 3. Tag nach Infektion.

Dieser Vorversuch entsprach im Ergebnis durchaus den Erwartungen: die Resorcinarsinsäure war ohne jeden Einfluß auf den Krankheitsablauf, die Lebensverlängerung der Kontrolle betrug im Durchschnitt nur einen Tag. Wenn auch bei Globucid und Cibazol die Differenz in der durchschnittlichen Lebensdauer zwischen behandelten und nichtbehandelten Mäusen wesentlich größer, eine Hemmung des Parasitenwachstums also unbestreitbar war, so konnte doch kein einziges Tier die Infektion überdauern.

Dieser letzte Befund scheint somit in Widerspruch zu stehen zu den in der Literatur vielfach beschriebenen Heilungserfolgen mit Sulfonamiden gerade bei der tierexperimentellen Toxoplasmosen. Die sehr unterschiedlichen Ergebnisse werden jedoch verständlich, wenn man die gleichermaßen unterschiedlichen Dosierungen berücksichtigt. Wolfschlag beispielsweise hatte in einem Versuch mit Cibazol eine Überlebensquote von 75 % beobachtet, nachdem über einen Zeitraum von 7 Wochen täglich 60 mg dieses Sulfonamids in flüssiger Diät, insgesamt also 3,0 g/g Maus verabreicht wurden. In unserem Falle hingegen bestand die Therapie nur in einer einmaligen Gabe von 2,0 mg/g Maus d.s. bei einem 25 g schweren Tier rund 50 mg.

Abb. 4: Wirksamkeit eines Gemenges aus Resorcinarsäure und Sulfonamiden (Globucid bzw. Cibazol) bei der tierexperimentellen Toxoplasmose.

Anzahl der Versuchstiere: je 10 Mäuse

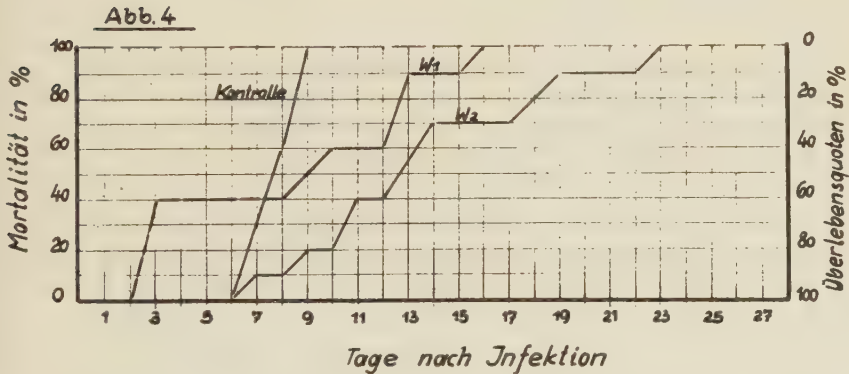
Infektionsdosis/Maus: 1500 Toxoplasmen

Therapie: 1 x 2,0 mg Cibazol bzw. Globucid / g Maus

+ 1 x 0,5 mg Resorcinarsäure /g Maus

Applikation: Globucid bzw. Cibazol peroral in 1%iger Adulsionslg
Resorcinarsäure in 2%iger wässriger Lösung

Therapiebeginn: 2 Tage nach Infektion



(Zum Kurvenverlauf von W_1 in Abb. 4 wäre zu bemerken, daß die 40 %ige Sterblichkeit 2 Tage nach der Therapie nicht so sehr als Folge der Applikationstechnik zu deuten ist, - Blutungserscheinungen im oberen Teil des Verdauungstraktus oder Perforation des Magens ließen sich bei keiner der Mäuse nachweisen - sondern zufolge ähnlicher Beobachtungen in späteren Versuchen als der Ausdruck einer spezifischen Unverträglichkeit des Globucids angesehen werden muß).

Das obige Versuchsergebnis läßt sich dahingehend zusammenfassen, daß die Therapie mit einem Mischpräparat aus den beiden Komponenten der Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen bei Toxoplasmose der weißen Maus erfolglos ist:

kein einziges Versuchstier übersteht die Infektion, die durchschnittliche Lebensverlängerung gegenüber der Kontrolle ist unbedeutend und als reine Sulfonamidwirkung zu werten.

Dies könnte zunächst als Beweis dafür gelten, daß die Kupplungsprodukte im Tierkörper nicht ohne weiteres sofort wieder in ihre Ausgangsstoffe gespalten werden, um sich dann in den Einzelwirkungen zu summieren oder zu potenzieren. Wahrscheinlicher ist vielmehr, daß der pharmakologische Effekt dieser Substanzen begründet ist in der spezifischen chemischen Verknüpfung der Einzelkomponenten zu einer neuen Verbindung. Rein theoretisch läßt sich ein solcher Effekt zwar kaum oder überhaupt nicht aus der chemischen Konstitution erklären oder gar vorhersagen. Jedoch ist folgendes bemerkenswert:

In den Kupplungsprodukten ist der Sulfonamidanteil durch eine Azogruppe mit dem aromatischen Arsinsäuremolekül verbunden. Eine ähnliche Struktur liegt auch bei den Sulfonamidazofarbstoffen vor, z.B. dem **Prontosil rubrum** und **Prontosil solubile**. Bei diesen Substanzen hatte man angenommen, daß das durch reduktive Spaltung aus ihnen entstehende p-Aminophenylsulfonamid die eigentliche Wirksubstanz sei. Nach Gley und Girard (55) ist jedoch der Anteil des reduktiv abgespaltenen Sulfonamids zu gering, als daß er die wesentlich gesteigerte Heilwirkung der Azoverbindungen gegenüber den einfachen Sulfonamiden erklären könnte. Diese soll vielmehr darauf beruhen, daß die Azoverbindungen in dem Entzündungsherd und im RES, also an den Stellen, an denen die Bakterien sich anreichern, gespeichert werden und so auch auf Grund physikalisch-chemischer Eigenschaften dieser Substanzen eine besonders intensive Berührung mit den Erregern zustande komme. Eine Reihe von "Versagern" unter den chemo-therapeutischen Mitteln muß bekanntlich dadurch erklärt werden, daß die Substanz überhaupt nicht oder nicht in genügender Konzentration an die Krankheitsherde gelangt.

Die Ähnlichkeit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kupplungsprodukte mit den Sulfonamidazofarbstoffen läßt einen Zusammenhang zwischen Wirksamkeit und reduktiver Spaltung möglich erscheinen. Es wurde darum der Versuch unternommen, den fermentativen Reduktionsvorgang im Organismus durch ein geeignetes Reduktionsmittel zu verstärken.

Zur experimentellen Prüfung der genannten Möglichkeit wurde nach einmaliger oraler Gabe eines Kupplungsproduktes täglich 1 cm³ einer 2 %igen Rongalitlösung subkutan injiziert. (Rongalit = stark reduzierendes Natriumformaldehydsulfoxylat) Das Ergebnis aus mehreren Versuchen ließ jedoch keinerlei Beeinflussung der Wirksamkeit durch das Reduktionsmittel erkennen.

Dieses Problem ist nach nach einer anderen Richtung verfolgt worden. Reduktionsprozesse im Organismus lassen aus den Kupplungsverbindungen neben anderen Reduktionsprodukten auch die zu ihrer Darstellung verwendeten Sulfonamide erwarten.

Nach den bestehenden Anschauungen, die besonders auf Arbeiten von Domagk basieren, hat man sich den Wirkungsorganismus dieser Chemotherapeutika so vorzustellen, daß der allen wirksamen Sulfonamidverbindungen zugrundeliegende Körper, das p-Aminobenzolsulfonamid, bestimmte für den Bakterienstoffwechsel lebenswichtige Enzymsysteme ausschaltet, indem es deren Kofaktor, die p-Aminobenzoessäure, verdrängt. Da diese Verdrängung quantitativ nach dem Massenwirkungsgesetz verläuft, ist zwischen dem Hemmstoff Sulfanilamid und dem Wuchsstoff p-Aminobenzoessäure ein Reaktionsablauf auch im entgegengesetzten Sinne möglich, d.h. die chemotherapeutische Wirkung der Sulfonamide kann wieder aufgehoben werden durch Zuführen des antagonistischen Wuchsstoffes von außen.

Wie bekannt, besitzen die Sulfonamide in entsprechend hohen Dosen bei der Toxoplasmose-Infektion eine gewisse Wirkung. Dieser Effekt müßte sich nach dem eben Gesagten durch die gleichzeitige Anwesenheit des Sulfonamidantagonisten p-Aminobenzoessäure aufheben lassen.

Eine Verminderung der Wirksamkeit wäre ferner auch bei den Arsen-Sulfonamid-Azofarbstoffen zu erwarten für den Fall, daß aus diesen Verbindungen durch fermentative Spaltung im Organismus neben anderen Reduktionsprodukten auch die Sulfonamidkomponente frei wird. Beide Möglichkeiten wurden in den folgenden Versuchen geprüft.

Abb. 5 und 6: Einfluß von p-Aminobenzoesäure (PAB, auf die Wirkung der Sulfonamide Globucid und Cibazol bei der tierexperimentellen Toxoplasmose.

Versuchsbedingungen in Abb. 5:

Infektionsdosis /Maus: 12 000 Toxoplasmen

Therapie: a) 10 Tiere erhalten am Tage der Infektion sowie am 3. und 5. Tag danach jeweils 3 mg Globucid pro g Maus

b) 10 weitere Tiere erhalten außer diesen Globucid-dosen 4 x täglich vom Tage der Inokulation an 1 cm³ 1 %iges p-Aminobenzoesäure-Natrium *)

Applikation: Globucid peroral in 1 %iger Adulsionslösung, PAB subkutan

Versuchsbedingungen in Abb. 6: (wie in Abb. 5, nur wird statt Globucid das Cibazol verabreicht)

*) Zur Herstellung der 1 %igen Injektionslösung wurde PAB zunächst in Wasser suspendiert und durch Erhitzen im Trockenschrank auf 70 - 80° in Lösung gebracht. Der pH-Wert liegt bei 3 - 4. Da die Substanz jedoch bei Raumtemperatur bereits wieder ausfällt, die Injektion also mit einer 40 - 50° heißen Lösung hätte durchgeführt werden müssen, wurde das Natriumsalz von PAB hergestellt, das sich vollständig und temperaturunabhängig auflöst. Der pH-Wert verbessert sich ferner auf 6,0.

Abb. 5

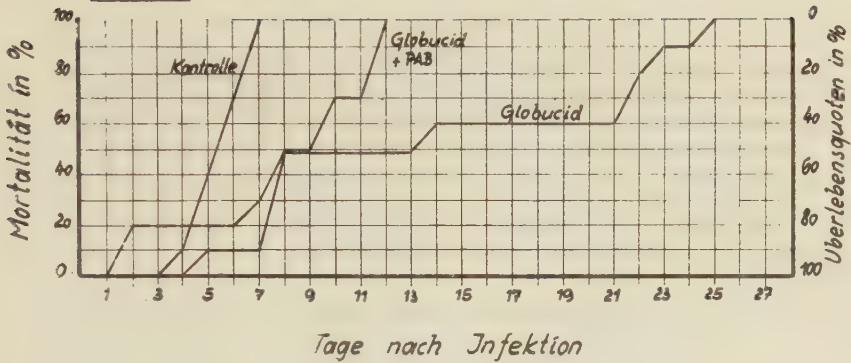
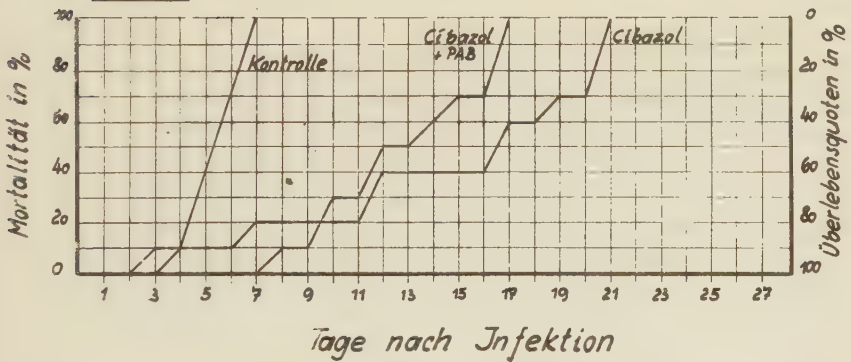


Abb. 6



(In den Abb. 5 und 6 scheidet der gestrichelte Kurvenverlauf für eine Bewertung aus. Da bei den angewandten Sulfonamid-dosen keine Zeichen von Unverträglichkeit zu beobachten waren, - Aussehen, Futteraufnahme, Ausscheidungen ugl. waren völlig normal - mußte diesmal der Grund für die Sterblichkeit 1 - 2 Tage nach Infektion in der schwächlichen Konstitution der verwendeten Tiere gesucht werden.)

Wie das Testergebnis zeigt, überlebte keines der mit Sulfonamiden behandelten Tiere die Infektion. Der Einfluß von PAB kann sich also nur in einer Abnahme der Lebensverlängerung auswirken. Tatsächlich ist sowohl bei Globucid als auch bei Cibazol ein geringer Wirkungsabfall durch die zusätzliche PAB-Gabe angedeutet. Wesentlich überzeugender tritt dieser Abfall des Hemmungseffektes jedoch in Erscheinung bei folgenden analogen Versuchen mit den Kupplungsprodukten.

Abb. 7 und 8: Einfluß von p-Aminobenzoesäure (PAB) auf die Wirkung der Kupplungsprodukte Resorcinarsinsäure-Globucid (S 20) und Resorcinarsinsäure-Cibazol (S 23) bei der tierexperimentellen Toxoplasmose.

Versuchsbedingungen in Abb. 7:

Infektionsdosis/Maus: 1500 Toxoplasmen

Therapie: a) je 10 Mäuse erhalten 2 Tage nach Infektion
1 x 80 % Dos.tol. "S 20" = 2,14 mg/g Maus bzw.
1 x 80 % Dos.tol. "S 23" = 2,00 mg/g Maus
b) je 10 weitere Mäuse erhalten außer diesen Dosen
am 2. und 3. Tag nach Infektion zusätzlich 1 cm³
1 %iges p-Aminobenzoesäure-Natrium

Applikation: "S 20" und "S 23" peroral in 1 %iger Adulsionslg.
PAB subkutan

Versuchsbedingungen in Abb. 8:

Infektionsdosis/Maus: 12000 Toxoplasmen

Therapie: a) je 10 Tiere erhalten
am Tage der Inf. 60 % Dos.tol."S 20" = 1,6 mg/g M.
bzw. 60 % Dos.tol."S 23" = 1,5 mg/g M.
am 5. Tg.nach Inf. 50% Dos.tol."S 20"= 1,34 mg/g M.
bzw. 50% Dos.tol."S 23"= 1,25 mg/g M.
b) je 10 weitere Tiere erhalten außer diesen Dosen
am Tag der Infektion sowie am 1., 5. und 6. Tag
nach Infektion zusätzlich 1 cm³ 1%iges p-Amino-
benzoesäure-Natrium

Applikation: (wie bei Abb. 7)

Abb. 7

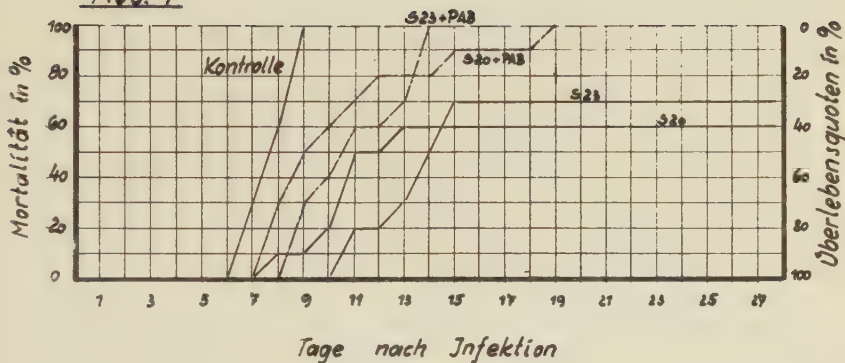
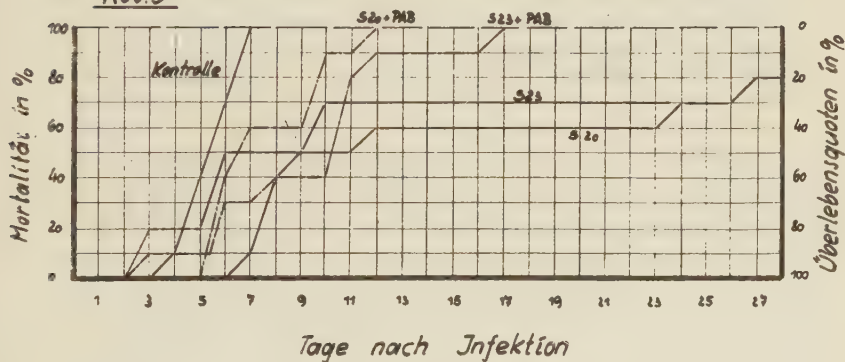


Abb. 8



Das Resultat der letzten beiden Versuche ist in mehrerer Hinsicht aufschlußreich:

- a) es bestätigt nochmals grundsätzlich die gute antitoxo-plasmotische Wirkung der Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen

- b) die wiederholte Therapie mit geringen Dosen bietet bei der experimentellen Mäusetoxoplasmose gegenüber einer einmaligen hochdosigen Medikation keine therapeutischen Vorteile.

Der Grund ist offenbar, daß die Versuchstiere durch die etwas schwierige Applikationstechnik und durch die auftretenden Durchfallerscheinungen eine starke Resistenzminderung erleiden.

- c) bei dem eindeutigen Wirkungsabfall der Kupplungsprodukte auf die gleichzeitige Gabe hoher Dosen von p-Aminobenzoesäure hin erscheint es als sehr wahrscheinlich, daß hier der bekannte Antagonismus zwischen dem Wuchsstoff p-Aminobenzoesäure und dem Hemmstoff Sulfanilamid zur Auswirkung gekommen ist. Voraussetzung dafür ist jedoch die reduktive Abspaltung der Sulfonamidkomponente aus den Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen, was in obigen Versuchen nachgewiesen werden sollte.

Weil vermutet wurde, daß die bei den Kupplungsprodukten auftretenden Durchfallerscheinungen als Nebenwirkung des Arsensäurerestes aufzufassen sind, interessierte die Frage, ob sich mit dem Ersatz des Arsensäurerestes durch eine andere saure Gruppe, z.B. die Karboxylgruppe, diese schlechte Verträglichkeit seitens des Magen-Darmtrakts beseitigen und die antitoxoplasmotische Wirksamkeit dabei in gleichem Maße erhalten läßt. Tatsächlich scheint diese Annahme durch nachfolgende Vergleichsteste eine gewisse Stütze zu finden.

Abb. 9 und 10: Wirksamkeit der arsenfreien Kupplungs-
produkte Resorcylsäure-Globucid (Tox 3)
und Resorcylsäure-Cibazol (Tox 2) bei
der tierexperimentellen Toxoplasmose.

Versuchsbedingungen in Abb. 9:

Anzahl der Versuchstiere: je 10 Mäuse

Infektionsdosis/Maus: 25000 Toxoplasmen

Therapie: 1 x 80 % Dos.tol "Tox 3" *) = 2,14 mg/g Maus bzw.

1 x 80 % Dos.tol "Tox 2" = 1,96 mg/g Maus

Applikation: peroral in 1 %iger Adulsionslösung

Therapiebeginn: 3 Tage nach Infektion

Versuchsbedingungen in Abb. 10:

Anzahl der Versuchstiere: je 10 Mäuse

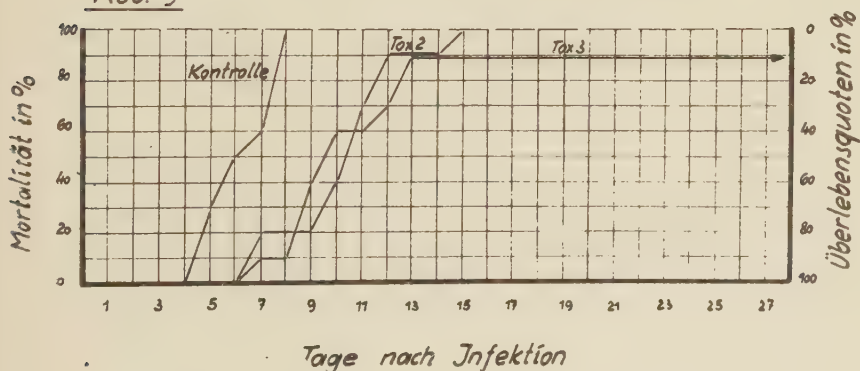
Infektionsdosis/Maus: 1500 Toxoplasmen

Therapie: jeweils 4 mg "Tox 3" bzw. "Tox 2" pro g Maus

Applikation: peroral in 1 %iger Adulsionslösung

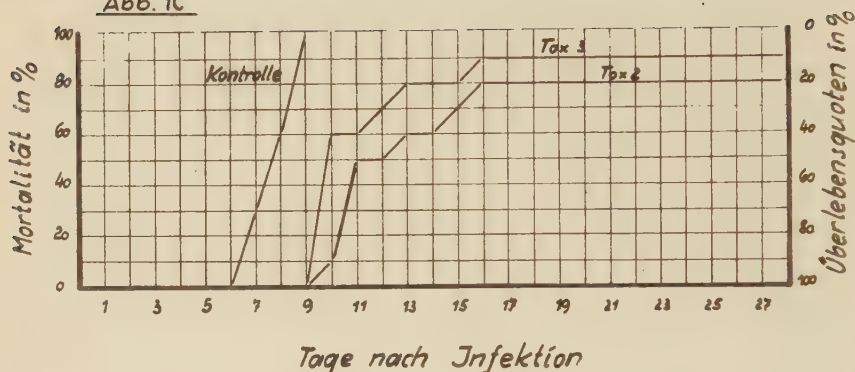
Therapiebeginn: 2 Tage nach Infektion

Abb. 9



*) Es wurde die Dos.tol der entsprechenden Resorcinar-
säure-Kupplungsprodukte zugrundegelegt, d.i. "S 20"
bzw. "S 23".

Abb. 10



Unter Berücksichtigung der hohen Infektionsdosis und der kurzen Zeitspanne zwischen Therapie und Tod der ersten Kontrolltiere (Abb. 9) kann den arsenfreien Kupplungsprodukten ein antitoxoplasmotischer Effekt nicht abgesprochen werden. Aber selbst unter günstigeren Versuchsbedingungen (Abb. 10) ist die Lebensverlängerung bzw. Lebenserhaltung der behandelten Mäuse im Vergleich zu den Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen geringer, d.h. der Ersatz der Arsensäuregruppe im Kupplungsprodukt durch die Karboxylgruppe führt bei der tierexperimenteller Toxoplasmose zu einem Wirkungsabfall.

Keines der Versuchstiere zeigte jedoch die bei den arsenhaltigen Kupplungsprodukten auftretenden Durchfälle. Diese erklären sich somit als Nebenwirkung des Arsensäurerestes. Ob bei einer protrahierten Verabreichung, etwa in Form einer festen Diät, die Verträglichkeit der Arsenazoverbindungen günstiger wird, bedarf noch der Klärung.

VII. Erfahrungen mit Daraprim sowie vorläufige

Testergebnisse mit Bemural und Bemuralderivaten

bei der tierexperimentellen Toxoplasmose.

In dem eingangs gebrachten Überblick über die wichtigsten bisherigen Therapieversuche wurde u.a. das Daraprim erwähnt. (s.S. 8), mit welchem Eyles und Coleman (30) bei infizierten weißen Mäusen gute Heilungsergebnisse erzielen konnten. Die genannten Autoren hatten eine mittlere Wirkungs-dosis von ungefähr 0,018 mg/g Maus berechnet und das Mittel 14 Tage lang nach Inokulation dem Tierfutter beigemischt.

Unter Anwendung der gleichen Dosierung führten wir im Gegensatz zu Eyles und Coleman die Medikation nicht in Form einer festen Diät durch, sondern verabreichten aus den schon früher erwähnten Gründen die Substanz ebenfalls peroral mit Hilfe einer Magensonde.

Das Ergebnis war überraschend: sämtliche Tiere gingen innerhalb weniger Minuten nach der Therapie unter heftigen krampfartigen Zuckungen der Extremitäten ein.

Obwohl keine Anzeichen dafür vorlagen, wurde die Ursache für diese Erscheinung zunächst in dem verwendeten Tiermaterial und einer fehlerhaften Dosierung gesucht. Nachdem aber in einem weiteren Versuch bei technisch einwandfreien Bedingungen die gleiche Erscheinung erneut auftrat, mußte angenommen werden, daß eine Dosis von 0,018 mg/g Maus für die Tiere hochtoxisch wirkt, wenn sie auf einmal verabfolgt wird, toxische Nebenerscheinungen jedoch ausbleiben, wenn entsprechend der Futteraufnahme die gleiche Menge auf kleinere Dosen und über einen ganzen Tag verteilt ist.

Diese Schlußfolgerung würde auch dem Befund der obigen Autoren entsprechen, wonach der therapeutische Index von Daraprim sehr klein ist. Er hat ihnen zufolge ungefähr der Wert 3.

Unter den Sulfonamiden ist in den letzten Jahren noch ein Verbindungstyp bekannt geworden, der außer gegen bakterielle Infektionen auch eine Wirksamkeit im Vogelmalaria- wie im Malariaphylaxeversuch, ungefähr in der Größenordnung des Chinins, entfaltet. Es sind in 3- und 5-Stellung des Anilidrestes durch Halogen oder Halogenalkyle substituierte Sulfanilsäureanilide.

Es war naheliegend, speziell solche Verbindungen mit antibakterieller und zusätzlicher Antiprotozoenwirkung gegen die Toxoplasmose einzusetzen, da diese Infektion eine Protozoenerkrankung ist, überraschenderweise jedoch auf Sulfonamide als ausgesprochene Bakterienmittel anspricht.

Wir prüfen zunächst das erstmals von Behnisch (56) dargestellte Sulfanilsäure-3,5-dibromanilid (= Bemural). Von dieser Verbindung ausgehend ist dann weiter untersucht worden, welchen Einfluß Stellungsänderungen der Substituenten im Molekül und die Einführung anderer Substituenten auf die toxoplasmostatische Wirksamkeit haben.

Zur Toxizitätsbestimmung wurde diesmal nicht das breit angelegte Verfahren von Behrens (53) verwendet, wo die Erhöhung bzw. Senkung der Dosen in geometrischer Reihe mit dem Quotienten 1,1 oder 1,2 erfolgt und pro Toxizitätsbestimmung bis zu 60 Tiere benötigt werden, sondern wir variierten von vornherein die Dosis in einem engeren Bereich von der Größenordnung, wie sie in früheren Versuchen mit Sulfonamiden vorgelegen hatte, d.h. zwischen 2,0 und 3,0 mg/g Maus. Tatsächlich zeigten sich bei dieser Menge keine auffälligen toxischen Nebenerscheinungen.

Für die Wirksamkeitsprüfung bei der experimentell gesetzten Toxoplasmose wurden auch diese Substanzen peroral in 1 %iger Adulsionslösung mit Magensonde appliziert. Die Medikation erfolgte am 2. und 4. Tag nach Infektion (2000 Toxoplasmen).

Nachstehend werden die getesteten Substanzen und ihre chemischen Abänderungen gegenüber Bemural aufgeführt. Das Testergebnis nach einer Beobachtungszeit von 4 Wochen ist aus Tabelle I ersichtlich.

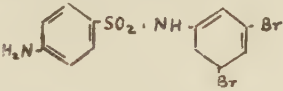
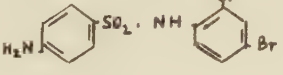
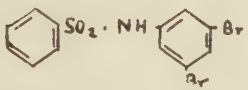
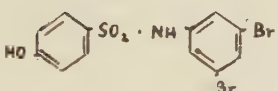
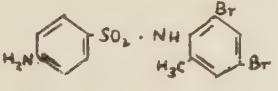
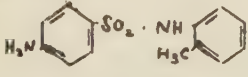
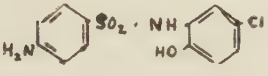
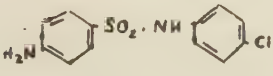
Tox 10:		Sulfanilsäure-3,5-dibromanilid
Tox 11:		Sulfanilsäure-2,4-dibromanilid
Tox 12:		Benzolsulfonsäure-3,5-dibromanilid
Tox 13:		p-Oxybenzolsulfonsäure-3,5-dibromanilid
Tox 14:		Sulfanilsäure-2,4-dibrom-6-methyl-anilid
Tox 15:		Sulfanilsäure-6-methylanilid
Tox 16:		Sulfanilsäure-3-chlor-6-oxyanilid
Tox 17:		Sulfanilsäure-4-chlor-anilid

Tabelle I

Sub- stanz	Dosis in mg/g Maus	Zahl der Tiere	Über- lebende	Tote	Durchschnittl. Lebensverläng. in Tagen d. behandelten Tiere gegenüber der Kontrolle
Tox 10	2,0	9	3	6	6,4
Tox 11	2,5	10	1	9	2,4
Tox 12	2,5	10	-	10	1,8
Tox 13	3,0	5	-	5	3,0
Tox 14	2,5	10	-	10	1,5
Tox 15	3,0	10	-	10	1,6
Tox 16	2,5	9	-	9	2,0
Tox 17	2,5	8	-	8	1,6

Mißt man den chemotherapeutischen Wert der Substanzen wieder an dem Prozentsatz der die Infektion überlebenden Mäuse und an der durchschnittlichen Lebensverlängerung der behandelten Tiere gegenüber der Kontrolle, so erweist sich das Bemural (=Tox 10) eindeutig als die wirksamste der getesteten Substanzen. Die isomere Verbindung "Tox 11" fällt in der Wirksamkeit stark ab, während alle übrigen Derivate bei der Toxoplasmose-Infektion der weißen Maus erfolglos sind.

Es erscheint darum bei einem Vergleich der strukturellen Unterschiede der einzelnen Derivate gegenüber Bemural, daß durch jeden Eingriff in das Molekül, der den Sulfonamidcharakter zerstört, sowie durch die Einführung weiterer als auch anderer Substituenten die Wirksamkeit praktisch verloren geht.

Am Ende der Beobachtungszeit wurden die 4 überlebenden Tiere getötet und ihre Gehirnsuspensionen auf gesunde Mäuse überimpft: in keinem der 4 Fälle ging die Infektion an.

Nach den bisherigen Erfahrungen in der tierexperimentellen Toxoplasmose schließt zwar der negative Ausfall einer einzigen Passage das Weiterbestehen eines Trägerstatus nicht vollständig aus, bedeutet aber zumindest die Auslöschung der akuten Infektion. Die obigen Ergebnisse mit Bemural und seinen chemischen Verwandten haben wegen des geringen Untersuchungsmaterials zunächst nur orientierenden Wert, und wir halten für ein abschließendes Urteil weitere Untersuchungen für notwendig.

Zusammenfassung.

Nach einem Überblick über die wichtigsten bisherigen Therapieversuche in der Klinik und im Laboratorium zur Toxoplasmose-Infektion wird über eigene tierexperimentelle Untersuchungen mit Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen berichtet. Der von Dubois in Zusammenarbeit mit der Erlanger Universitäts-Frauenklinik gefundene Hemmungseffekt dieser Substanzen bei der Laborinfektion der weißen Maus konnte in mehreren Versuchsreihen grundsätzlich bestätigt werden. Maßstab für den Wirkungsgrad war dabei die Überlebensquote sowie die durchschnittliche Lebensverlängerung der behandelten Tiere gegenüber den Kontrolltieren.

Näher geprüft worden ist die Abhängigkeit der chemotherapeutischen Wirksamkeit von der Stärke der jeweils zugrundeliegenden Infektion, ferner von Therapiebeginn und Dosierung: die Wirksamkeit fällt mit steigender Infektion; früh einsetzende Therapie mit einer einmaligen hohen Dosis erweist sich einer Medikation mit kleineren wiederholten Dosen als überlegen.

Weitere Versuche dienten der Aufklärung über die eigentlichen chemotherapeutischen Wirkformen der genannten Azoverbindungen.

In der gleichen quantitativen Größenordnung, in der die beiden Komponenten dieser Substanzen in ihren Kupplungsprodukten vorliegen, wurden sie je für sich allein und als Mischpräparat bei der experimentellen Mäusetoxoplasmose getestet. Den Ergebnissen zufolge ist ihr guter Hemmungseffekt bei dieser Infektionskrankheit nicht in einem rein additiven Synergismus oder einer wechselseitigen Potenzierung der Arsen- und Sulfonamidkomponente zu suchen.

Es wird ferner auf die Ähnlichkeit in Struktur und Wirkung mit den Sulfonamidazofarbstoffen eingegangen.

Der Wirkungsabfall der Arsen-Sulfonamid-Azoverbindungen nach gleichzeitiger Gabe hoher Dosen von *p*-Aminobenzoesäure als Antagonisten von Sulfanilamid läßt die fermentative Abspaltung des Sulfonamidanteils als möglich erscheinen. Versuche, die reduktive Spaltung im tierischen Organismus durch geeignete Reduktionsmittel zu verstärken, waren ohne Erfolg.

Der Ersatz des Arsensäurerestes im Molekül der Kupplungsprodukte durch eine andere saure Gruppe führt zwar zum Verschwinden unerwünschter toxischer Nebenerscheinungen, hat aber einen starken Abfall der chemotherapeutischen Wirkung zur Folge.

Zum Schluß folgen Erfahrungen mit Darsprim und vorläufige Testergebnisse mit dem Sulfanilsäure-3,5- dibromanilid Bemural sowie Derivaten dieser Verbindung.

L i t e r a t u r - V e r z e i c h n i s

1. Nicolle, C. et Manceaux, L. C.r.Acad.Sci.Paris 147,763 (1908)
2. Sabin, A.B. Proc.Soc.Exper.Biol.a.Med. 41,75 (1939)
3. Wolf, A. and Cowen, D. Bull.Neurol.Inst.N.Y. 6,306 (1937)
- , - Bull.Neurol.Inst.N.Y. 7,226 (1938)
- , - and Paige, B.H. Amer.J.Path. 15,657 (1939)
4. Mayer, J.B. Ärztl.Wschr. 4,36 (1949)
5. Janku, J. Casop.lek.Cesk. 62,1021,1052,1081,1111,1138, (1923)
6. Craig and Faust Clinic.Parasitology, Lea and Febiger
Philadelphia 4th edit. (1945)
7. Cross, B.J. J.inf.Dis. 80,278 (1947)
8. Westphal, A. Z. Tropenmediz. u. Parasitol. 1,526 (1950)
9. Warrner, J. a. Sabin, A. Proc.Soc.Exper.Biol.a.Med. 51,15 (1942)
10. Sjögren Brit.J.Opth. 34,752 (1950)
11. Tjötta u. Mitarb., zit. n. Winsser, J. Ergebn.d.Hyg.Bakt.
27,75 (1952)
12. Straub, W. Dtsch.med.Wschr. 26,890 (1951)
13. Sautter Toxoplasmose u. Auge Tag.Rhein.-Westf. 1950
14. Franke, H. Therap.d.Gegenw. 11,404 (1953)
15. Müller, F. Toxoplasmose, Fischer Verl. Jena, 55 (1954)
16. Warren, J. and Sabin, A.B. Proc.Soc.Exper.Biol.a.Med. 51,19 (1951)
17. Summers, W.A. Amer.J.Trop.Med. 29,889 (1949)
18. Levaditi, C. u. Schoen, R. C.r.Soc.Biol. 99,1126 (1928)
19. Adams, F.H., Cooney, M., Adams, J.M., Kabler, P.
Proc.Soc.Exper.Biol.a.Med. 70,2,258 (1949)
20. Weinman, D. and Berne, R. J.A.M.A. 124,6 (1944)
21. Wolfschlag, A.J. Z.f.Kinderheilk. 69,564 (1951)
22. Biocca, E. u. Nobrega, P. Arg.Inst.Biol.San Paulo 16,83 (1945)
23. Frenkel, J.K. J.Trop.Med. 2,390 (1953)
24. Summers, W.A. Amer.J.Trop.Med. 29,889 (1949)
25. Thiel, P.H. Nederl.Tijdschr.Geneesk. 93,3818 (1949)
26. Knapp, W. Med.Welt 20,554 (1951)
27. Biocca, E. u. Nobrega, P. Arq.de Biol. 30,63 (1946)
28. Cross, B.J. Amer.J.Trop.Med. 29,473 (1949)
29. Falco, E.A. Brit.J.Pharmacol. 6,185 (1951)
30. Eyles, E. and Coleman, N. Publ.Health Rep. 67,249 (1952)

31. Greenberg, J. and Richeson, E. M.
J. Pharmacol. and Exper. Therap. 99, 444 (1950)
32. Eyles, E. a. Coleman, N. Antibiotics a. Chemoth. 3, 483 (1953)
33. Augustine, Weinman, Mc. Allister Science 99, 19 (1944)
34. Cross, J. B. and Anigstein, L. Tex. Rep. Biol. Med. 6, 260 (1948)
35. Forrest, H. A. Intern. Med. Digest 54, 117 (1949)
36. Freeman, P. a. Pryor, H. B. J. Pediatr. St. Louis 36, 365 (1950)
37. Bohn, H. und Koch, E. Med. Welt 20, 547 (1951)
38. Nelson, T. L. and Mantz, F. A. J. Ped. 35, 378 (1949)
39. Jacobs, L. J. Trop. Med. 2, 365 (1953)
40. Mohr, W. Handb. d. inn. Med. 1, 730 (1952)
41. Kaess, E. and Steen, E. Acta path. 28, 165 (1951)
42. Steen, E. Acta. path. scand. 27, 844 (1950)
43. Eyles, E. a. Coleman, N. Antibiotics a. Chemoth. 9, 998 (1954)
44. Eichenwald, H. Amer. Dis. Childr. 76, 307 (1948)
45. Cuboni, E. Ann. San. Publ., Rome 12, 3 (1951)
46. Franke, H. u. Horst, H. B. Dtsch. med. Wschr. 1049 (1951)
47. Bohn, H. und Koch, E. Med. Welt 20, 547 (1951)
48. Frenkel, J. K. J. A. M. A. 140, 369 (1949)
49. Warren, Joel, and Russ, Sudie B. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.
67, 85 (1948)
50. Mohr, W. und Westphal, A. Med. Klin. 45, 1167 (1950)
51. Dubois, H. Dissertationsarbeit, Erlangen, 1953
52. Pfleger, R. Habilitationsarbeit, Erlangen (1947)
53. Behrens, B. zit. n. Ther, L. Pharmakol. Methoden S. 10,
Wissenschaftl. Verlagsgesellsch. Stuttgart, 1949
54. Voegtlin, C. and Smith, H. W. J. Pharm. a. Exp. Therapeutics
15, 453 (1920)
55. Gley et Girard, zit. n. Domagk, G. und Hegler, C.
Chemoth. bakt. Infektionen S. 104 (1944)
56. Behnisch, E. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 81, 297 (1948)

L e b e n s l a u f

Am 16. August 1929 wurde ich, Vinzenz Scheu, als Sohn des Zahnpraktikers Josef Scheu und seiner Ehefrau Emma, geb. Mahr, in Unterschleichach geboren.

Von 1936 bis 1940 besuchte ich hier die Volksschule, anschließend die Oberschule Haßfurt a.M.. 1947 wechselte ich auf die Oberrealschule Bamberg über und legte dort im Juli 1949 die Reifeprüfung ab.

Nach 2 Semestern Neuphilologie begann ich im SS 1951 das Studium der Zahnmedizin an der Universität Erlangen und bestand hier im Juli 1952 die zahnärztliche Vorprüfung sowie im Februar 1955 das zahnärztliche Staatsexamen.

Für die freundliche Überlassung des Themas bleibe ich Herrn Prof. Dr. D y r o f f stets zu Dank verpflichtet.

Danken möchte ich ferner Herrn Dr. B o r n für seine wertvollen Anregungen und Hinweise bei der Durchführung dieser Arbeit.

